Devoto omaggio

Istituto di Patologia Generale della R. Università di Torino C Pulcher

Dott. C. Pulcher

S 582

Intorno alla situazione dei leucociti nel sangue fluente

Estratto dall'*Archivio per le Scienze Mediche*

Vol. LVI - N. 3 (Marzo 1932)

TORINO
TIPOGRAFIA EDITRICE « MINERVA »
1932

Istituto di Patologia Generale della R. Università di Torino

Dott. C. Pulcher

Intorno alla situazione dei leucociti nel sangue fluente

Il sangue è un sistema costituito da una fase liquida omogenea, il plasma e da una fase dispera solida, composta da numerosissime particelle microscopiche, gli elementi formati; quest'ultimi appartengono tutti a poche categorie di corpuscoli simili fra loro se della stessa categoria, ma differenti da una ad un'altra categoria tanto per grandezza, forma, densità, viscosità superficiale quanto per numero nell'unità di volume del sangue. Non tutti i corpuscoli, data questa diversità di forma e struttura, si comportano nel liquido allo stesso modo sotto la azione d'una forza motrice; gli eritrociti si muovono p. es. tanto nella corrente sanguigna quanto durante la sedimentazione in modo diverso dai granulociti e questi a loro volta altrimenti dei linfociti. Noi vediamo perciò che in un sangue che contenga dovunque lo stesso numero di elementi formati, un movimento qualsivoglia dei corpuscoli è accompagnato costantemente da una variazione nella distribuzione delle emazie e dei leucociti. Questo fenomeno si osserva nel sangue circolante nei sanguiferi, nella centrifugazione e sedimentazione o quando una goccia di sangue venga distesa su di una superficie piana per lo striscio.

Questi fatti dei quali sono notissime le manifestazioni non sono chiariti riguardo il meccanismo che li cagionano. Perciò ho intrapreso delle ricerche sulla distribuzione degli elementi formati in seguito a movimenti del sangue ed ho incominciato dallo studiare la situazione degli eritrociti e leucociti nel sangue mentre esso scorre in un tubo capillare di vetro.

Intorno alla posizione degli elementi del sangue fluente in un capillare di vetro esiste un lavoro fondamentale di Schklarewsky (1) eseguito sotto la guida di v. Recklinghausen e di v. Helmholtz e pubblicato incompletamente nel 1868. L'A. faceva scorrere in un capillare di vetro del lume di 0,25 mm. tenuto in posizione verticale, sangue di rana e sospensioni di granuli mi-

croscopici di varia natura. La situazione dei corpuscoli nella corrente del liquido veniva determinata mediante l'osservazione microscopica. Lo Schklarewsky osservò che i corpuscoli rossi scorrono nella parte assiale del lume vasale mentre i leucociti rotolano, commisti a globuli rossi, nelle parti più periferiche del liquido. Con altre osservazioni eseguite su granuli di carminio, grafite, cinabro e con goccioline di latte e colofonio, sospese in liquidi salini, l'A. constatò che i corpuscoli più voluminosi si muovono nell'asse della corrente come gli eritrociti del sangue di rana mentre i più piccoli rotolano nelle parti periferiche alla guisa dei leucociti. Il fenomeno s'accentua col crescere della velocità del flusso. Adoperando granuli e gocciole di qualità diversa e di grandezza pressochè eguale, scorrono nell'asse quelli di densità maggiore. L'A. spiega questi fenomeni ammettendo che per il sangue valga la regola scoperta da v. Helmholtz, secondo la quale vanno nella corrente assiale « i corpuscoli che cadono più rapidamente » mentre i corpuscoli più leggeri rotolano nelle parti più periferiche ad una velocità minore. I corpuscoli rossi della rana cadono infatti nel sangue secondo lo Schklarewsky alla velocità di 0.00711 mm/sec. e i leucociti a quella di 0,0019 mm/sec. Questi dati furono ottenuti da osservazioni sulla sedimentazione del sangue di rana.

R. Thoma (2) ripetè nel 1910 gli esperimenti dello Schklarewsky e i risultati furono da lui riassunti nella puntata 194 del manuale dei metodi biologici Abderhalden. L'A. avendo perfezionato il metodo dell'osservazione microscopica studiò particolarmente il formarsi della zona plasmatica nel capillare di vetro in rapporto alla posizione di questo ed alla velocità del sangue. Egli osserva però (pag. 1162) che non è mai riuscito ad ottenere col sangue di mammifero « nei tubi di vetro una tipica posizione marginale dei leucociti, per quanto avesse rallentato convenientemente la velocità della corrente del sangue ».

I risultati sperimentali dello Schklarewsky ottenuti col sangue di rana pur non avendo avuto alcuna conferma per quanto riguarda il sangue di mammifero furono tuttavia estesi al sangue di questi animali e la posizione marginale dei leucociti nei vasi piccoli venne ammessa da tutti gli A. e riportata dai trattatisti più insigni come un fatto acquisito in accordo con le leggi della fisica (Tigerstedt: « Der Kreislauf », Marchand: « Allgm. Pathologie », vol. IV, parte I).

Soltanto nel 1928 venne risollevata la questione della posizione delle singole categorie di elementi nella corrente del sangue

dal Fähreus e da lui studiata con un nuovo metodo (3 - 4). Egli partì dalla premessa che il movimento del sangue in un tubo di vetro capillare avvenga come per i liquidi perfetti con lo spostamento rettilineo di lamelle concentriche con un massimo della velocità nell'asse della corrente ed un minimo alle pareti del tubo dove il liquido è pressochè fermo. Quando in un tubo capillare si faccia scorrere una sospensione di corpuscoli questi saranno diminuiti di numero nel capillare in ragione della velocità alla quale percorrono il tubo, cioè in ragione della posizione che occupano nella corrente. Fähreus partendo da questa premessa s'è valso del seguente metodo per la determinazione della situazione degli elementi formati nella corrente del sangue. Egli aspirava del sangue in un capillare sino a riempirlo completamente ed eseguiva su di esso il conteggio dei corpuscoli rossi e bianchi determinando inoltre coll'ematocrito la quantità del plasma. Aspirava quindi lo stesso sangue una seconda volta e continuava coll'aspirazione finchè del sangue uscissero alcune goccie dall'estremità distale del capillare. Toglieva quindi dal capillare il sangue e ripeteva su di questo i conteggi. Le differenze in elementi corpuscolati fra i due sangui, cioè fra il sangue contenuto immobile nel capillare ed il sangue fluente nello stesso hanno permesso all'A. di valutare le velocità relative del plasma e delle varie categorie di elementi. Gli esperimenti, riportati soltanto sommariamente, fanno concludere al Fahreus che le cellule più grandi, cioè i granulociti e monociti, devono trovarsi nell'asse della corrente sanguigna mentre gli eritrociti occupano una zona più laterale ed i linfociti una posizione intermedia; il plasma si muoverebbe invece più lentamente dei corpuscoli formando la zona più periferica detta appunto plasmatica. Il peso specifico dei globuli non avrebbe un'influenza nel cagionar la loro situazione nel capillare mentre il fattore determinante di questo fenomeno sarebbe il volume degli elementi. Queste osservazioni furono fatte con capillari di vetro di lume inferiore ad un millimetro.

Ho trovato i lavori del Fähreus nel ripassare la letteratura su quest'argomento quando ultimati gli esperimenti stavo scrivendo il manoscritto del presente studio. Le mie ricerche iniziate indipendentemente da quelle del Fähreus ne differiscono sia nel programma che nel metodo degli esperimenti.

Per studiare la distribuzione e la situazione degli elementi corpuscolati nel sangue che scorre in un capillare di vetro, ho abbandonato l'osservazione diretta ma, fatto fluire una piccola

quantità definita di sangue in un capillare di vetro, eseguivo il conteggio degli elementi formati di questo sangue su dieci porzioni successivamente uscite dal tubo di vetro. Con questo metodo intendevo di verificare se e come il movimento nel capillare modificasse la distribuzione dei vari elementi corpuscolati in seno ai vari segmenti della colonna del liquido; eventuali modificazioni nella distribuzione delle singole categorie di corpuscoli avrebbero potuto informarmi sulla velocità degli spostamenti compiuti dai corpuscoli di ciascuna di quelle categorie.

Il capillare da me adoperato, lungo 127 cm. e col lume di 0 34 mm., era suddiviso da 9 segni ben visibili in 10 segmenti di volume pressochè eguale (11 mmc.), tutti singolarmente tarati per pesata col mercurio. Alcuni esperimenti furono fatti col capillare ridotto per rottura a otto segmenti. Da un imbutino applicato all'estremità superiore facevo scorrere nel tubo, tenuto in posizione verticale, sangue di cavia reso incoagulabile con aggiunta di NaFl e ossalato di K fintanto che il tubo ne fosse totalmente riempito. Il sangue scendeva nel capillare per gravità con una velocità ad un di presso costante di 5 - 10 mm/sec. Quindi lasciavo scorrere le singole dieci porzioni della colonna del sangue in altrettante ampolline nelle quali avevo prima introdotto una nota quantità di liquido di diluizione. Dovendo procedere separatamente alla conta dei globuli rossi ed a quella dei bianchi una volta mescolavo il sangue a soluzione fisiologica al 0,8 % per la conta dei primi e poi ripetevo per la conta dei leucociti l'immissione di altrettanto sangue in ampolline contenenti un liquido così costituito: 10 cmc. NaCl 0,4%, 2 cmc. soluzione regolatrice Sörensen citrato pH 5, 0,6 cmc. verde di metile 1 %, 0,2 cmc. eosina 1 %, 1 mg. di saponina.

La conta dei globuli rossi veniva eseguita nella camera Bürker. Quella dei bianchi pure nella Bürker essendomi possibile, mediante il liquido di diluizione adoperato, di distinguere ciascuna delle diverse categorie dei leucociti dall'aspetto dei nuclei e dal contenuto di granuli. L'osservazione veniva fatta con l'obiettivo Zeiss D 40 e con l'oculare K 15 (tubo 150 mm.), che davano un ingrandimento sufficiente per apprezzare i caratteri morfologici dei singoli elementi; le granulazioni eosinofile e pseudoeosinofile si colorano intensamente in rosso, i nuclei in verde azzurro.

Ho riportato in forma tabellare il risultato dei conteggi di tre esperimenti. I numeri romani (I - X) di queste e delle tabelle successive indicano le porzioni di sangue sulle quali sono stati

eseguiti i conteggi secondo l'ordine di deflusso dal capillare. Nella colonna indicata con « controllo » sono riportati i conteggi eseguiti sul sangue adoperato per il riempimento del capillare.

TABELLA N. 1

Esperimento 21-XII-1929.

Sangue	Elementi corpuscolati nel mmc. di sangue				
	Leucociti	Granulociti neutrofili	Linfociti	Monociti	Granulociti eosinofili
Controllo	4962	3100	1330	266	266
I	10932	7570	2190	946	266
II	5421	3860	1190	371	
III	3158	2080	616	308	154
IV	6216	4260	1150	423	383
V	3834	2220	1000	307	307
VI	3650	1705	1545	325	81
VII	1714	490	980	163	81
VIII	748		748		
IX	652	81	571		
X	166		166		

TABELLA N. 2

Esperimento 7-I-1930 - Velocità del sangue nel capillare: 5 mm/sec.

Sangue	Elementi corpuscolati nel mmc. di sangue				
	Leucociti	Granulociti neutrofili	Linfociti	Monociti	Granulociti eosinofili
Controllo	5873	3155	2350	139	229
I	21730	12440	6780	1270	1240
II	6395	3060	2707	510	118
III	7322	3682	2751	647	242
IV	6327	2861	2701	483	282
V	8114	4239	3230	242	403
VI	6906	3283	3027	341	255
VII	3213	1200	1885		128
VIII	740	43	697		
IX	941		941		
X	307		307		

TABELLA N. 3

Esperimento 16-I-1930 - Velocità del sangue nel capillare: 9 mm/sec.

Sangue	Corpuscoli nel mmc. di sangue					
	Eritrociti (milioni)	Leucociti	Granulociti neutrofili	Linfociti	Monociti	Granulociti eosinofili
Controllo	4,22	4556	2030	2343	138	45
I	5,21	18835	10750	6520	1500	75
II	4,46	7269	3160	3770	304	35
IV	4,17	5602	2395	3060	118	39
VI	4,24	8158	3400	4400	358	
VII		5083	1670	3330	83	
VIII	2,91	2632	127	2420	85	
IX		1750		1750		
X	2,24	853		853		

Questi conteggi hanno dimostrato concordemente che la porzione di sangue che esce per prima dal capillare contiene in confronto al controllo un numero 3 - 4 volte maggiore di granulociti, un numero 5-10 volte più grande di monociti e un numero doppio di linfociti, mentre l'aumento delle emazie è del 25-30 %. Nella porzione seconda persiste l'aumento dei granulociti e monociti mentre il numero delle emazie e dei linfociti è aumentato di poco in confronto a quello del sangue controllo. Nelle porzioni III, IV, V e VI i valori per le tre categorie di elementi corpuscolati non si scostano che poco da quelli del sangue di controllo pur sorpassandoli in qualcuna di queste porzioni, ma senza una regola fissa. Nella porzione VII si trova costantemente una brusca diminuzione dei granulociti e monociti. Questi elementi mancano di solito completamente nelle tre porzioni (VIII, IX, X) che per ultime escono dal capillare. Anche i linfociti sono in numero minore nelle porzioni stesse ma non si arriva mai alla loro totale scomparsa. L'emazie sono pure esse diminuite nelle ultime porzioni e nella decima esse sono ridotte circa alla metà. Una diecina di esperimenti eseguiti con sangue di cavia fatto scorrere nel capillare hanno dimostrato che quando una piccola quantità definita di sangue attraversa un tubo di vetro del lume di 0,34 mm., i granulociti e monociti escono in maggior copia dal capillare con le prime porzioni di sangue e che lo stesso fatto in minore misura si verifica per i linfociti mentre l'emazie non sono nelle prime porzioni che moderatamente aumentate in confronto dei controlli. Nel sangue che forma la coda della colonna liquida fluente nel capillare si osserva il fenomeno inverso, cioè la totale assenza dei granulociti e monociti, una diminuzione forte dei linfociti, mentre la diminuzione delle emazie non sorpassa il 50 % dei valori trovati nel controllo, cioè nel sangue adoperato per l'esperimento.

Il fenomeno descritto è senza dubbio cagionato da fattori molteplici; perciò per precisarne alcuni ed eventualmente mettere in evidenza il principale di essi, fu necessario di saggiare uno ad uno quelli che supponevo più probabili modificando in vario modo l'esperimento.

Per verificare l'effetto della gravità nella produzione del fenomeno che ho descritto, ho fatto l'introduzione e la colata del sangue a capillare orizzontale e ho potuto constatare che la gravità non è affatto in causa nel cagionare la ineguale distribuzione degli elementi formati nel sangue che successivamente fluisce dalla bocca del capillare. A dimostrare questo asserto

bastano le poche cifre che a scopo di brevità ho riferito nella tabella seguente, tabella relativa soltanto ai risultati dell'indagine sul primo, medio e penultimo segmento.

TABELLA N. 4

Esperimento 17-II-1930. - Il capillare è posto in posizione orizzontale. Pressione sul sangue = 70 cm. di acqua. Elementi formati nel mmc. di sangue.

Sangue	Leucociti	Granulociti neutrofili	Linfociti	Monociti	Granulociti eosinofili
Controllo	8070	2790	5190		90
I	20240	8740	10750	339	411
V	9120	2835	6130		157
IX	1448	128	1320		

Una seconda modificazione è stata suggerita dal presupposto che il movimento dei vari corpuscoli potesse risultare differente se il liquido trascorre un tratto di parete di vetro perfettamente secca (come era stato nel primo esperimento) o se esso si muove lungo una parete previamente umettata di un liquido che sia omogeneo a quello nel quale i corpuscoli sono sospesi. Per risolvere questa questione ho ripetuto l'esperimento dopo aver fatto passare attraverso il capillare una corrente di plasma citratato, prelevato dal sangue che doveva essere poi colato nel tubo. Nella tabella N. 5 sono riportate le cifre effettive ricavate dal conteggio dei globuli col capillare asciutto e poi bagnato di plasma citratato. Anche in questa tabella, come nelle successive, sono riportati per brevità i conteggi eseguiti sulle porzioni estreme del sangue.

TABELLA N. 5

Esperimento 3-V-1930. - Capillare di n. 8 segmenti. Numero di corpuscoli contati in 144 quadrati grandi della camera Bürker.

Sangue	Leucociti	Granulociti neutrofili	Linfociti	Monociti	Granulociti eosinofili
Capillare secco					
I	332	170	151	9	2
VIII	17	1	16		
Capillare bagnato					
I	320	187	125	7	1
VIII	11		11		

I risultati di questi esperimenti dimostrano che la secchezza della parete capillare non ha importanza sulla situazione dei globuli nelle varie sezioni della colonna di sangue defluente.

Che l'adesione del liquido alla parete del capillare non abbia importanza nel cagionare il fenomeno descritto è risultato dal confronto delle cifre corrispondenti alla distribuzione dei globuli dopo il passaggio a contatto con una parete secca e a quello con una parete spalmata di olio di vaselina o, ciò che è da preferirsi, rivestita di un sottilissimo strato di paraffina fusibile a 60°.

TABELLA N. 6

Esperimento 27-I-1930. - La parete del capillare ricoperta di paraffina. Velocità del sangue nel capillare: 3,5 mm/sec. Elementi formati nel mmc. di sangue.

Sangue	Eritrociti (milioni)	Leucociti	Granulociti neutrofili	Linfociti	Monociti	Granulociti eosinofili
Controllo	4,96	12480	3300	8070	855	255
I	6,51	32800	11860	18040	2120	780
X	2,40	2470	45	2425		

Un'altra modificazione del mio esperimento ha avuto lo scopo di chiarire l'eventuale influenza del calibro del tubo sulla distribuzione degli elementi formati del sangue. A tal fine ho tirato dei capillari con calibro non superiore a 0,1 mm. e per lo più inferiore a questo. Per poter avviare il sangue attraverso un siffatto capillare e farvelo trascorrere con la consueta rapidità, ho soffiato una piccola bolla olivare all'estremità del capillare. In questa introducevo pochi mmc. di sangue e ad essa applicavo una pera d'insufflazione. Il sangue spinto dalla pera scorreva lungo il capillare e all'uscita veniva strisciato su una lamina di celofan distesa sul cilindro di un chimografo rotante alla massima velocità. La lamina di celofan era percorsa da una striscia di sangue che nelle sue successive sezioni corrispondeva ai periodi di deflusso dal capillare. Con la colorazione col liquido di Giemsa della detta striscia mi fu possibile di approssimativamente valutare il contenuto dei leucociti in ciascun segmento e fino ad un certo punto riconoscere le varietà dei leucociti. Quest'esperimento, sebbene non altrettanto esatto dei precedenti, ha dimostrato in modo evidente differenze nel numero dei leucociti corrispondenti a quelle trovate negli esperimenti antecedenti e quindi provato che anche la strettezza del tubo non è un fattore essenziale per la distribuzione dei corpuscoli nel sangue fluente.

Stabilito in via generale che le qualità fisiche ed il calibro

del capillare non hanno un'essenziale importanza sulla distribuzione della varie specie di leucociti nel sangue mi sono proposto di studiare se la distribuzione stessa fosse da mettere in rapporto con qualità fisiche del liquido di sospensione e con il valore e la densità dei globuli sospesi.

Il primo quesito m'indusse a sostituire con soluzione fisiologica il plasma del sangue seguendo le solite norme della lavatura dei corpuscoli per centrifugazione. I risultati di questa prova hanno dimostrato in modo evidente la mancanza di ogni nesso causale con la composizione del liquido di sospensione, cioè con la presenza od assenza dei colloidi del plasma.

TABELLA N. 7

Esperimento 12-III-1930. - Sangue di cavia lavato e molto diluito.

	Elementi corpuscolati nel mmc. di sangue					
Sangue	Eritrociti	Leucociti	Granulociti neutrofili	Linfociti	Monociti	Granulociti eosinofili
I		6422	3430	2320	132	340
II	1.530.000					
IX		593		593		
X	769.000					

Per studiare la distribuzione degli elementi morfologici in relazione con il loro volume ho sostituito per l'esperimento del capillare sangue di rana a quello di cavia allo scopo di constatare se il fenomeno della precedenza nell'uscita dallo sbocco dei leucociti si verificasse o no in un sangue nel quale il volume dei globuli rossi fosse notevolmente maggiore di quello dei leucociti, ripetendo sotto variate forme l'esperimento fondamentale eseguito dallo Schklarewsky appunto sul sangue di rana. Ed ecco che i risultati dello Schklarewsky per questa specie di sangue si adattavano a quelli da me ottenuti; poichè quell'A. aveva veduto i leucociti rotolare lungo la parete del vaso e gli eritrociti, come corpi più pesanti, sollecitati da una velocità maggiore, tendevano verso l'asse della corrente ed io trovavo che allo sbocco del capillare venivano più rapidamente proiettati i globuli rossi che i bianchi e quindi nei primi segmenti il numero dei rossi risultava maggiore che non nei segmenti successivi. Dalla tabella N. 8 risulta inoltre una gradazione del numero degli elementi formati in rapporto con la loro grandezza in quanto che la rappresentanza dei leucociti segue a quella dei globuli rossi e precede quella dei trombociti.

TABELLA N. 8

Esperimento 5-VI-1931. - Sangue di rana eparinizzato. Elementi corpuscolati nel mmc. di sangue. Capillare a n. 8 segmenti.

Sangue	Eritrociti (24,4 × 16,3 μ)	Leucociti e trombociti	Leucociti % (10,3 μ)	Trombociti % (6,3 μ)
Controllo	163000	7170	57	43
I	368000	5160	61	39
II	271000	2610	70	30
III	121000	3070	20	80
VII	85500	4320	13	87
VIII	63900	3920	19	81

Il valore di quella gradazione non potrebbe essere considerato come assoluto essendo la sostanza delle tre specie di corpuscoli di diverso volume non identica. Perciò ho creduto di dover ripetere l'esperimento mescolando varietà di globuli rossi di diversa grandezza, al fine di escludere il dubbio che la graduatoria stabilita nella tabella N. 8 fosse più o meno fittizia. A tale scopo ho mescolato globuli ovali nucleati di grandezza notevolmente diversa; cioè globuli rossi di pollo (12,5 × 6,8 μ) e globuli di rana (24,4 × 16,3 μ). I risultati sono assolutamente evidenti. I globuli rossi di pollo più piccoli sono diminuiti di numero nella prima porzione in confronto al sangue di controllo e nell'ultima porzione vi è un leggero aumento del loro numero. Gli eritrociti della rana di volume maggiore sono per contro raddoppiati di numero in confronto al sangue di controllo nella porzione che esce prima dal capillare e ridotti a meno di un quinto nel sangue che ne fiuisce per ultimo.

TABELLA N. 9

Esperimento 30-IV-1930. - Eritrociti di pollo e di rana. Capillare di n. 8 segmenti.

Sangue	Eritrociti nel mmc. di sangue: Pollo (12,5 × 6,8 μ)	Eritrociti nel mmc. di sangue: Rana (24,4 × 16,3 μ)
Controllo	944.000	100.000
I	774.000	220.000
II	1.001.000	145.000
IV	942.000	89.900
VIII	1.090.000	19.000

Con la constatazione dell'influenza del volume dei corpuscoli sulla loro situazione nella corrente del sangue è stato trovato un fattore essenziale del fenomeno da me segnalato col primo

esperimento sul sangue di cavia. Non di meno restava ancora da studiare l'influenza della densità dei vari corpuscoli; dal momento che il punto di partenza delle mie ricerche riguardavano appunto sospensioni di corpuscoli, non solo di diversa grandezza ma anche di costituzione differente. Questo studio mi è parso tanto più necessario in quanto la supposta posizione marginale dei leucociti nella corrente del sangue viene fatta risalire alla minore densità dei globuli bianchi. Perciò mi sono curato di determinare la densità dei leucociti, basandomi sulla velocità di caduta di questi elementi direttamente determinata. Tale determinazione ho eseguito col metodo seguente: costruivo una celletta di vetro a forma di uno stretto canale (mm. 20 × 0,5 × 0,2) ed introducevo in questa una sospensione rada di globuli del sangue ma relativamente ricca di granulociti, in confronto degli altri elementi sospesi. Il liquido di sospensione era costituito di regola da soluzione clorosodica citratata, ma in qualche esperimento ho aggiunto a questa soluzione un terzo d'albume d'uovo con lo scopo di aumentare la densità e viscosità del liquido di sospensione. La celletta veniva posta in situazione perfettamente verticale davanti all'obiettivo (Zeiss D. 40, Oc. 7) del microscopio in posizione orizzontale. Nell'oculare del microscopio era disposto un micrometro. Seguendo la caduta dei granulociti e quella degli eritrociti attraverso lo spazio di 40 divisioni del micrometro (0,017 cm.) ne ricavavo la velocità dello spostamento dei globuli osservati. Acquistata la cognizione di detta velocità ho facilmente stabilito che essa è notevolmente maggiore per i leucociti in confronto all'emazie e dall'altro canto ho potuto, in base alle velocità di caduta dei granulociti, calcolare secondo la legge dello Stokes la densità dei granulociti stessi. Naturalmente questa legge, la quale presume una forma sferica dell'elemento non è applicabile agli eritrociti discoidi. La legge di Stokes per la caduta di corpi sferici in un mezzo liquido è espressa dalla seguente relazione:

$$\delta = 4:5 \frac{\eta \ v}{r^2 g}$$

dove con r è indicato il raggio della sfera, con g l'accelerazione per la gravità, con v la velocità di caduta della sfera, con η la viscosità del mezzo e con δ la densità del corpuscolo cercata ($\triangle$) diminuita della densità del mezzo δ_1. Potendo determinare sperimentalmente i valori di v, η e δ_1 ricavavo dall'eguaglianza $\triangle = \delta + \delta_1$ il valore di $\triangle$ cioè la densità dei corpuscoli. La vi-

scosità del liquido di sospensione (η) veniva determinata col viscosimetro di Ostwald e calcolata dalla nota relazione:

$$\frac{\eta}{\eta_2} = \frac{t_1 \ \delta_1}{t_2 \ \delta_2}$$

dove con $t_1 \ \delta_1$ sono indicati rispettivamente il tempo di discesa del liquido nel viscosimetro e la sua densità, mentre $t_2 \ \delta_2$ esprimono questi valori per l'acqua distillata e η_2 la viscosità dell'acqua espressa in valori assoluti cm. g. sec.

Riporto dal protocollo degli esperimenti i dati dell'osservazione del 5-V-1931. Leucociti del peritoneo di cavia, eritrociti da una goccia di sangue. Temp. 15°. Liquido di sospensione: NaCl 0,8 = + 1,1 % citrato di Na. Densità 10.112. Viscosità del liquido: 127,7″. Viscosimetria dell'acqua: 120″. Tempo impiegato dagli elementi per attraversare n. 40 divisioni della scala micrometrica (= 0,0174 cm.):

Granulociti	Eritrociti
78,3	137,3
82	160
73,8	127,5
70,6	142,5
86,5	167,5
79,5	120,7
83	159,3
65,7	134
83,5	178,5
67	107,2
Media 76,9	Media 143,4

Nella tabella n. 10 sono riassunti i risultati di quattro esperimenti e la densità dei granulociti calcolata per elementi del raggio medio di 6,5 μ.

La densità dei granulociti di cavia è risultata di 1,039 $\pm$ $\pm$ 0,002. Il peso medio di questi elementi può essere quindi valutato a circa 1196×10^{-12} g. Molti lavori trattano della densità e del peso delle emazie. La prima varia da 1.09 a 1.1 mentre il secondo è stato valutato a 95×10^{-12} g. Dalle mie determinazioni è risultato che i granulociti, pur avendo una densità inferiore a quella dell'emazie, cadono nel liquido con velocità doppia di quest'ultime e hanno un peso 10 volte maggiore.

Un allievo del Laboratorio, lo studente L. Rigoletti, ha determinato la densità dei linfociti della cavia. Per ottenere questi

TABELLA N. 10

Esp.	Temp.	Liquido nei quale erano sospesi i corpuscoli: Composizione	Densità (δ_1)	Viscosità in cm. g." (η)	Velocità di caduta (V) in mm." Granulociti	Velocità di caduta (V) in mm." Eritrociti	Densità granulociti (raggio 6.5 μ)
27-III-'31	13° - 14°	NaCl 0,7 % + 0,6 citrato	10.086	0.0110	0.00238	0.00119	1.037
5-V-'31	15°	NaCl 0.8 % + 1.1 citrato	10.112	0.0119	0.00226	0.00122	1.040
6-5-'31	15°,1	NaCl 0.8 % + 1.1 citrato	10.112	0.0119	0.002	0.00097	1.037
7-V-'31	15°,3	NaCl 0,8 % + 1.1 citrato + ⅓ di albume d'uovo	10.294	0.029	0.00041	0.00025	1.042

Media delle densità = 1.039

elementi in sospensione pura, spappolava in soluzione fisiologica linfoghiandole fresche di cavia. Alla sospensione di elementi della categoria linfocitaria venivano aggiunti degli eritrociti. La velocità di caduta delle cellule linfocitarie ottenute per spappolamento risultò in media di poco superiore a quella delle emazie cioè di 0.00168 mm″ e la loro densità calcolata per elementi del raggio di 3.8 μ in due esperimenti pari rispettivamente a 1.0638 e 1.0609 ed il loro peso di circa 249×10^{-12} g. Gli elementi linfocitari pur avendo una densità maggiore dei granulociti cadono nel liquido più lentamente di questi e un po' più rapidamente dell'emazie.

La determinazione del peso dei granulociti e linfociti della cavia rende perfettamente comprensibile perchè essi precedano le emazie nella caduta verso lo sbocco del capillare e quindi si presentino molto più numerosi nelle prime porzioni della colonna uscita dal capillare stesso. I miei risultati appaiono in netta contraddizione con quelli che, fondandosi sull'osservazione della circolazione nella rana avevano condotto a dichiarare marginale la situazione dei leucociti, mettendo il fatto empiricamente constatato in relazione con il peso dei leucociti minore di quello dei globuli rossi. Una tale dichiarazione fu senz'altro estesa alla situazione dei leucociti di qualsivoglia animale. I miei studi fatti sulla caduta dei globuli di pesi diversi (rana, cavia) mentre confermano la possibilità della situazione marginale nella rana non possono accettare questa situazione per i leucociti della cavia, dei quali ho dimostrato che pesano dieci volte più dell'emazie dello stesso animale. A conforto della mia presupposizione ho ripetuto l'esperimento della misurazione di velocità di caduta su una sospensione di eritrociti e granulociti di rana, e ho constatato che i primi cadono nella soluzione clorosodica 0.6 %, con la velocità di 0.00518 mm″, mentre i secondi cadono con la velocità di 0,00311 mm″.

Essendo così confermato che l'esperimento con sangue di cavia dà risultati opposti a quelli ottenuti col sangue di rana in relazione con i diversi rapporti di peso fra leucociti e globuli rossi nei due animali, mi son proposto di verificare direttamente e possibilmente di fissare con la fotografia la reale situazione dei leucociti in una sospensione di corpuscoli del sangue, nella corrente del liquido contenuto in un capillare del diametro di 0.3 - 0.25 mm. e della lunghezza di 1 mm. in posizione verticale. L'osservazione fu fatta nel modo seguente: la porzione del capillare più vicina allo sbocco veniva collocata a fuoco entro una camera

d'acqua a faccie parallele nel campo del microscopio in posizione orizzontale e nel capillare stesso scorreva una sospensione rada di granulociti ed emazie di cavia contenuti nel liquido gli uni e le altre in numero pressochè eguale.

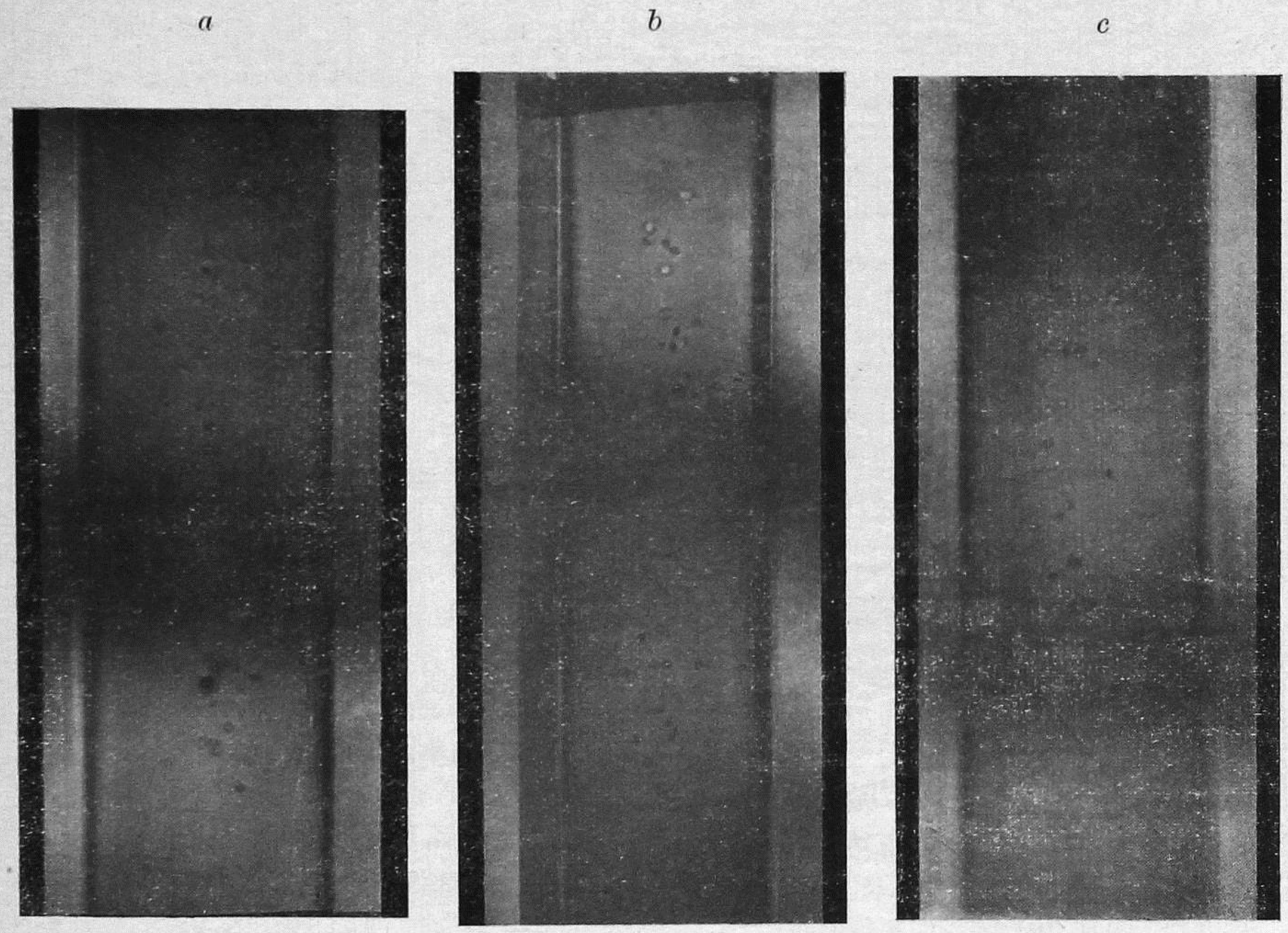

Fig. 1. — Esposizione $^1/_{6000}$ di sec. La banda nera dei fotogrammi è dovuta alla inversione dei poli dell'arco voltaico della corrente alternata.

Un'improvvisa interruzione del flusso della corrente ha reso possibile di riconoscere i vari corpuscoli nella situazione che essi avevano durante il flusso. Quest'osservazione mi ha permesso di constatare che i leucociti scorrevano nell'asse o a breve distanza da questo, commisti ad emazie, ma che la zona marginale, rimasta libera anche nel primo momento dopo il brusco arresto della corrente era totalmente priva di globuli bianchi. Dopo ripetute prove sono riuscito a fissare mediante la fotografia la situazione dei leucociti durante il flusso della corrente.

I fotogrammi ottenuti sono riprodotti nella figura n. 1 e non hanno bisogno di spiegazione o commento.

Gli esperimenti avendo dimostrato che le varie categorie di

corpuscoli si muovono nel capillare con velocità diversa a cagione della loro posizione nella corrente, mi son proposto di utilizzare i risultati di uno dei primi esperimenti, eseguiti sul sangue di cavia, per ricercare attraverso la determinazione di queste velocità qualche indizio sulla situazione di alcune categorie di corpuscoli nella corrente del sangue. Per determinare le velocità dei diversi tipi di elementi corpuscolati mi son valso del percorso medio compiuto da essi nel capillare confrontato al percorso medio del sangue totale nel capillare stesso. Il percorso medio venne calcolato dalle variazioni della posizione, media rispetto alle estremità del capillare, dei diversi elementi formati, variazioni conseguenti al passaggio del sangue attraverso il capillare; la posizione media dei corpuscoli venne ricavata dalla rappresentazione grafica del numero dei corpuscoli nei dieci segmenti del capillare.

Le aree inferiori GM, L ed E della fig. 2 rappresentano le quantità rispettive dei granulociti e monociti, dei linfociti e degli eritrociti, distribuiti uniformemente nei 10 segmenti del capillare quali si troverebbero nel tubo di vetro se nel sangue non fossero avvenuti spostamenti reciproci degli elementi formati. Perciò le aree che rappresentano il numero dei corpuscoli nei dieci segmenti del capillare sono proporzionali al lume del capillare stesso che s'assottiglia leggermente dal segmento I a quello X. La linea orizzontale finemente punteggiata rappresenta la posizione media degli elementi rispetto alle estremità del capillare. Le aree G_1 M_1, L_1 ed E_1 poste sopra le prime e spostate rispetto a queste di una lunghezza del capillare, rappresentano graficamente il numero dei corpuscoli nei dieci segmenti del capillare dopo che il sangue ha percorso il tubo di vetro. La linea orizzontale finemente punteggiata indica ancora la posizione media del sangue totale mentre le altre linee orizzontali indicano le posizioni medie rispettivamente dei granulociti e monociti, dei linfociti e dell'emazie.

Da questa rappresentazione grafica risulta con evidenza che mentre la massa totale del sangue si è spostata di 10 (lunghezza del capillare), gli eritrociti hanno compiuto un percorso eguale a 10.8, i linfociti uno pari a 11 e i granulociti uno eguale a 13,5. Essendo ora la strada percorsa dagli elementi nell'unità di tempo, proporzionale alla loro velocità, è evidente che, posta la velocità del sangue pari a 100, la velocità degli eritrociti sarà di 108, quella dei linfociti sarà di 110 e quella dei granulociti pari a 135. Partendo dal presupposto che la velocità delle lamelle

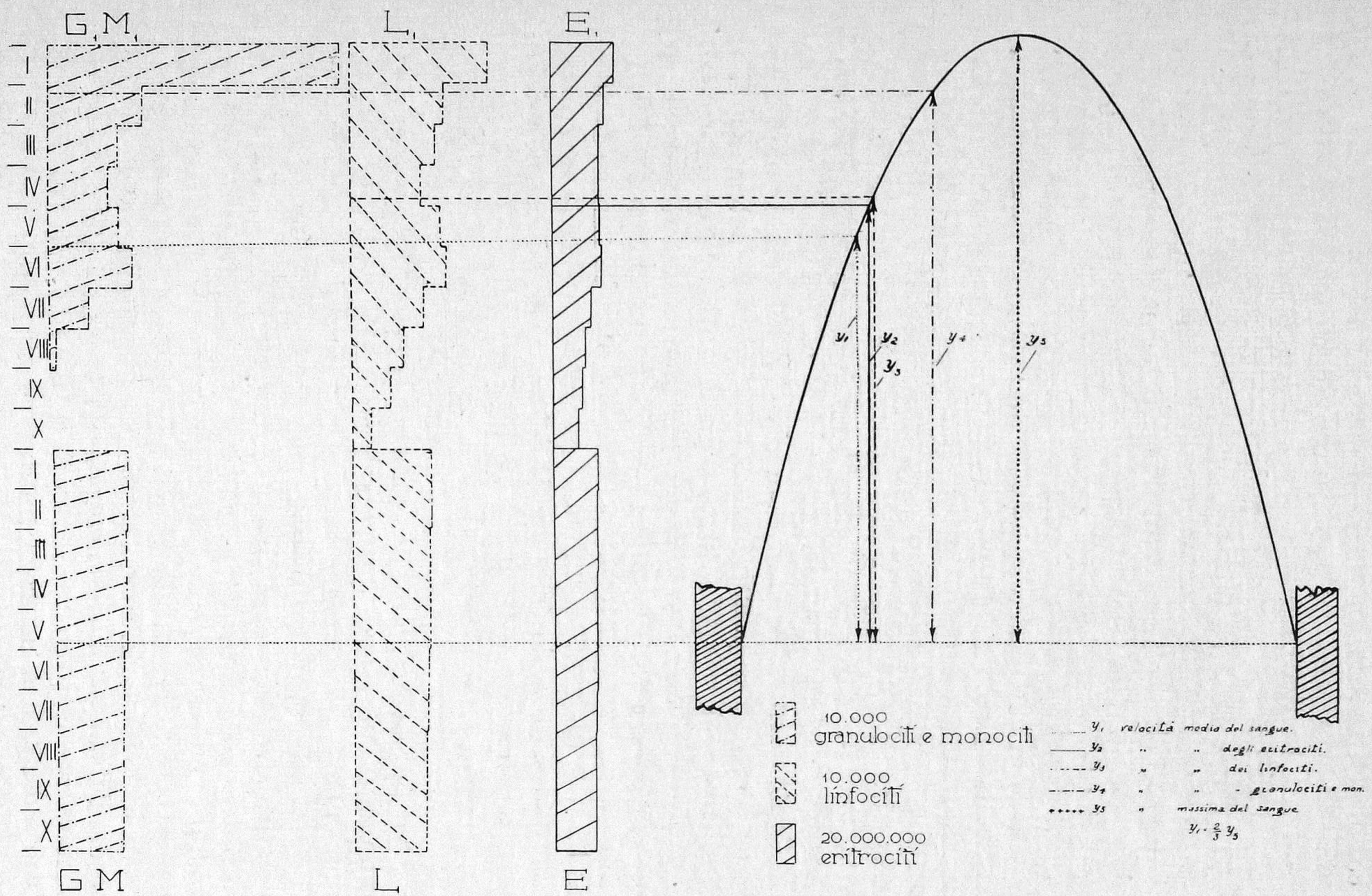
G, M,
L,
E,
I
II
III
IV
V
VI
VII
VIII
IX
X
GM
L
E
y_1
y_2
y_3
y_4
y_5
10.000
granulociti e monociti
10.000
linfociti
20.000.000
eritrociti
y_1 velocità media del sangue.
y_2 " " degli eritrociti.
y_3 " " dei linfociti.
y_4 " " - granulociti e mon.
y_5 " massima del sangue.
$y_1 = \frac{2}{3} y_5$

Fig. 2.

liquide del sangue aumenti dalla parete del vaso all'asse con andamento parabolico, ho costruito la parabola della velocità delle lamelle del sangue fluente nel capillare, avendo cura di far coincidere il percorso medio del sangue totale con l'ordinata corrispondente alla velocità media del sangue (y_1). Prolungando le orizzontali delle posizioni medie dei corpuscoli fino alla parabola della velocità, ho ottenuto le ordinate corrispondenti alla velocità media degli eritrociti (y_2), dei linfociti (y_3), dei granulociti e monociti (y_4). Dalla posizione delle ordinate y_1, y_2, y_3 è lecito dedurre che nel sangue di cavia, fluente nel capillare di 0.34 mm. alla velocità di 5-10 mm″, i granulociti e monociti saranno situati in una zona abbastanza ampia intorno all'asse della corrente mentre i linfociti saranno distribuiti in un raggio molto più vasto ma un po' minore di quello dell'emazie. In altri esperimenti la velocità media dei linfociti risultò un po' superiore e la corrispondente ordinata più vicina quindi a quella dei granulociti.

Questi risultati basati sui dati sperimentali infirmano completamente l'ipotesi dedotta per calcolo matematico da R. Thoma (2), secondo la quale in un capillare col lume più piccolo di 1 mm., i corpuscoli scorrerebbero tutti nella zona assiale con velocità pressochè eguale senza spostamento reciproco degli elementi formati mentre soltanto le lamelle liquide della zona plasmatica si muoverebbero con velocità progressivamente più grande dalla parete del vaso verso la zona assiale occupata dai corpuscoli.

Conclusioni

Ho fatto scorrere in un capillare di vetro del lume di 0,34 millimetri una piccola quantità di sangue di cavia alla velocità di 5 - 10 mm″.

A mezzo di conteggi degli elementi formati di questo sangue, eseguiti su dieci porzioni successivamente defluite dal tubo di vetro, ho constatato che i granulociti e monociti percorrono il capillare più velocemente dei linfociti e che quest'ultimi si muovono con velocità maggiore dei globuli rossi. La velocità dei granulociti e monociti è del 30 % circa più grande della velocità media del sangue fluente nel capillare, mentre i globuli rossi si muovono ad una velocità che sorpassa del 10 % circa la velocità media del sangue stesso. I linfociti percorrono il capillare un po' più velocemente delle emazie.

Gli esperimenti hanno dimostrato che nel sangue fluente nel

capillare i globuli bianchi sono situati in media più vicini all'asse della corrente che non le emazie e che la posizione dei granulociti e monociti nella corrente è più assiale di quella dei linfociti.

Fotografie di sospensioni rade di granulociti e globuli rossi di cavia fluenti in capillari di vetro hanno confermato che i leucociti scorrono più vicini all'asse che non le emazie.

Questi fatti si spiegano con la legge secondo la quale i corpuscoli che cadono nel liquido più rapidamente hanno una tendenza maggiore di portarsi verso l'asse della corrente. Ho constatato infatti che la velocità di caduta nella soluzione fisiologica citratata dei granulociti di cavia è di 0.0023 mm″, che quella dei linfociti è di 0.0016 mm″, mentre l'emazie cadono alla velocità di 0.0012 mm″.

Applicando la legge dello Stokes per la caduta dei corpi sferici nei liquidi ho determinato la densità dei leucociti di cavia. I granulociti hanno una densità pari a 1.039, i linfociti una pari a 1.062. Poichè è noto che la densità delle emazie è di 1.09 - 1.1, dagli esperimenti è risultato che la minore densità dei corpuscoli bianchi non basta da sola a cagionare la loro situazione marginale nella corrente del sangue.

La situazione marginale dei leucociti constatata nei capillari di vetro per il sangue di rana si spiega col fatto che i globuli bianchi di quest'animale cadono nella soluzione clorosodica 0.6 %, secondo le mie osservazioni, alla velocità di 0.0031 mm″ cioè meno rapidamente degli eritrociti che cadono alla velocità di 0.0058 mm″.

Questi risultati sperimentali infirmano: 1) l'opinione corrente che nel sangue di mammifero i leucociti abbiano nel sangue fluente una situazione più laterale delle emazie; 2) la spiegazione secondo la quale la posizione marginale dei leucociti che s'osserva durante l'infiammazione nei piccoli vasi sia cagionata dal minor peso specifico di questi elementi; 3) l'ipotesi sostenuta dal Thoma secondo la quale nei vasi col lume più piccolo di 1 mm. i corpuscoli si muovano tutti nell'asse della corrente con velocità eguale.

BIBLIOGRAFIA

(1) A. Schaklarewsky: *Archiv. f. d. ges. Physiol.*, 1, 1868.
(2) R. Thoma: *Handb. d. biol. Arbeit.*, Abderhalden Abt. V, Teil. 4. p. 1103.
(3) R. Faehreus: *Klin. Woch.*, *7*, 100, 1928.
(4) R. Faehreus: *Physiol. Reviews*, *9*, 265.

Estratto dall'*Archivio per le Scienze Mediche*

Vol. LVI - N. 3 (Marzo 1932)